

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hasil Penelitian Terdahulu

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hernroth *et al.* (2018) membuktikan salah satu manfaat ion Mangan (Mn) dalam bidang kesehatan. Penelitian dengan judul “*Manganese Inhibits Viability of Prostate Cancer Cells*” bertujuan menyelidiki apabila Mn dapat mengurangi viabilitas kanker prostat melalui induksi apoptosis. Hasil dari penelitian tersebut menyimpulkan bahwa logam Mn memiliki potensi sebagai pilihan terapi untuk menghambat pertumbuhan sel kanker prostat dan mampu meningkatkan penangkapan siklus sel dan apoptosis pada jalur sel.

Penelitian yang juga dilakukan oleh Allen (2001) yang berjudul “*Current Status of Phthalocyanines in The Photodynamic Therapy of Cancer*” menyebutkan bahwa *phthalocyanine* merupakan fotosensitizer yang sangat kuat dan memberikan efek pada terapi fotodinamik. Pengobatan antikanker preklinik secara fotodinamik menggunakan senyawa *phthalocyanine* dapat menginduksi apoptosis sel. Dan seperti yang dilaporkan oleh *The State Research Center for Laser Medicine* (Moscow, Russia) bahwa 85% pasien kanker kulit memberikan respon terhadap terapi fotodinamik dengan *phthalocyanine*.

Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Staicu *et al.* (2013) berjudul “*Studies about Phthalocyanine Photosensitizers to be used in Photodynamic Therapy*” bertujuan untuk melihat karakteristik fotofisika dari *phthalocyanine* sebagai fotosensitizer dalam PDT dari segi oksigen singlet. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa semua kompleks senyawa logam dengan *phthalocyanine* yang diteliti dapat menghasilkan oksigen singlet dengan nilai *quantum yield* yang berbeda-beda.

MnPc juga memiliki aktivitas antikanker pada *Hepatocellular carcinoma cells* (Hep-G2) dengan dilakukannya penelitian oleh Aziza A.K (2019) yang berjudul “*Preparation, Characterization and Biological Activity Study of Manganese (II) Phthalocyanine Complex*” yang bertujuan untuk mengetahui karakteristik dan penggunaan MnPc dalam bidang biologi dan bidang kesehatan. Hasil menunjukkan bahwa MnPc dapat digunakan

sebagai antikanker dengan diperoleh IC50 sebesar 23,1 μM yang termasuk toksik moderat.

Sementara itu MnPc diketahui memiliki aktivitas antikanker dengan metode PDT dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Prasetyoningsih (2019) yang berjudul “*Karakteristik Fisikokimia Senyawa Manganese(II) Phthalocyanine Untuk Terapi Kanker Secara Fotodinamik*” yang bertujuan untuk mengetahui karakteristik fisikokimia senyawa MnPc sebagai fotosensitizer. Hasil prediksi absorpsi senyawa MnPc bersifat lipofilik dengan $\log P = 4,85$ sehingga senyawa dapat berdifusi ke dalam sel tumor tetapi tidak dapat bertahan di dalam membran intraseluler. Lalu untuk hasil pengukuran spektrum absorpsi dan nilai absorptivitas molar (ϵ) adalah $\lambda = 707,5 \text{ nm}$ dengan $\epsilon = 9.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, maka senyawa Mn(II)Pc dapat berpenetrasi ke jaringan yang lebih dalam. Dan juga senyawa Mn(II)Pc dapat menghasilkan oksigen singlet pada pH 6,3 dan 7,4 dengan nilai *quantum yield* oksigen singlet ($\Phi\Delta$) sebesar 0,14 dan pengukuran nilai *quantum yield* fluoresensi (ΦF) pada senyawa Mn(II)Pc adalah 0,01. Berdasarkan pada penelitian tersebut, maka untuk meneliti lebih lanjut secara biologis dilakukan penelitian untuk mengevaluasi MnPc yang mempunyai aktivitas lemah dalam keadaan tanpa penyinaran dan memiliki aktivitas toksik yang kuat sebagai antikanker terhadap sel kanker payudara T47D secara PDT.

2.2 Landasan Teori

2.2.1 Kanker

Kanker adalah suatu kondisi dimana sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya, sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali. Peningkatan jumlah sel tak normal ini umumnya membentuk benjolan yang disebut tumor atau kanker (Tjahdadi, 2008). Kanker adalah sekelompok penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan dan penyebaran sel abnormal tidak terkontrol yang dapat menyebabkan kematian. Penyebab kanker dapat berupa faktor internal seperti, mutasi genetik yang diturunkan, hormon, dan kondisi kekebalan tubuh, serta faktor eksternal yang menyangkut gaya hidup seperti mengonsumsi

narkoba dan kelebihan berat badan. Faktor resiko tersebut dapat bertindak secara bersamaan atau berurutan untuk memulai pertumbuhan kanker (American Cancer Society, 2017).

Dalam keadaan normal, sel hanya akan membelah diri jika ada penggantian sel-sel yang telah mati dan rusak. Sebaliknya sel kanker akan membelah terus meskipun tubuh tidak memerlukannya, sehingga akan terjadi penumpukan sel baru yang disebut tumor ganas. Penumpukan sel tersebut mendesak dan merusak jaringan normal, sehingga mengganggu organ yang ditempatinya (Brunner & Suddarth, 2001). Tumor merupakan istilah umum yang digunakan untuk menunjukkan adanya pertumbuhan yang tidak normal dari massa atau jaringan yang membahayakan tubuh. Tumor terbentuk karena adanya mutasi pada biosintesis sel, yaitu kekeliruan urutan DNA karena terpotong, tersubstitusi, atau adanya pengaturan kembali, adanya adisi dan integrasi bahan genetik virus ke dalam gen, dan adanya perubahan ekspresi genetik. Tumor yang membahayakan disebut kanker (Siswandono, 2000).

Proses pembentukan kanker dikenal dengan karsinogenesis yang merupakan kejadian somatik dan diduga disebabkan karena akumulasi perubahan genetik dan epigenetik yang menyebabkan perubahan dalam pengaturan normal kontrol molekuler perkembangbiakan sel. Perubahan genetik tersebut dapat berupa aktivasi proto-onkogen dan atau inaktivasi gen penekan tumor yang dapat memicu pembentukan tumor (Kondo, 1993). Proses pertumbuhan kanker dapat terjadi melalui tiga tahap, yaitu tahap inisiasi, promosi, progresi dan metastatik. Tahap inisiasi merupakan tahap awal yang berlangsung sangat cepat dan terjadi aktivasi onkogen dan inaktivasi gen penghambat tumor (*Tumor Necrosis Factor/TNF*). Pada tahap ini terjadi perubahan genetik dan kerusakan DNA yang irreversible akibat senyawa genotoksik seperti senyawa kimia, radiasi, dan virus berkaitan secara langsung dengan DNA. Tahap promosi merupakan lanjutan dari tahap inisiasi, yaitu perubahan ke arah prakanker (pre-malignant) akibat adanya pengaruh

dari paparan karsinogen yang berulang-ulang dalam jangka waktu yang lama dan bersifat reversible. Tahap progresi merupakan periode antara premalignant dan kanker, pada tahap ini terjadi kerusakan genetik yang menyebabkan transformasi tumor benigna menjadi maligna. Sel maligna ini kemudian mampu mengalami metastasi ke jaringan lain di seluruh tubuh. Tahap promosi dan progresi memerlukan waktu yang lama untuk berkembang menjadi kanker (Tsao *et al.*, 2004).

2.2.2 Kanker Payudara

Kanker payudara adalah massa ganas yang berasal dari pembelahan diluar kendali sel-sel yang ada di jaringan payudara (Sukardja, 2000). Kanker payudara dapat berasal dari jaringan payudara itu sendiri atau dari jaringan lain yang merupakan hasil metastase dari kanker lain. Kanker payudara juga dikatakan sebagai suatu proliferasi keganasan sel epitel yang membatasi duktus atau lobus payudara (Price, 2005). Beberapa faktor yang dapat menyebabkan kanker payudara antara lain adalah faktor genetik, hormonal, dan lingkungan. Perubahan genetik ini termasuk perubahan atau mutasi dalam gen normal, dan hubungan protein yang menekan atau meningkatkan perkembangan payudara (Brunner & Suddarth, 2001).

Penentuan stadium kanker payudara dapat didasarkan pada hasil dari pemeriksaan fisik, biopsi dan tes pencitraan (stadium klinis), atau hasil dari tes tersebut ditambah hasil dari pembedahan (stadium patologis) ketika luasnya penyebaran kanker ditemukan setelah proses pembedahan. Stadium pada kanker biasanya dinyatakan dengan angka pada skala dari 0 sampai IV. Dengan stadium 0 menggambarkan kanker non invasif yang tetap pada lokasi asalnya dan stadium IV menggambarkan kanker yang invasif telah menyebar keluar dari bagian payudara ke bagian tubuh lainnya. Stadium kanker berbeda dengan grade kanker walaupun keduanya menggunakan angka sebagai skalanya. Stadium kanker berskala 0 sampai IV sedangkan grade kanker berskala 1 sampai 3. Suatu grade kanker payudara ditentukan

berdasarkan pada bagaimana bentuk sel kanker dan perilaku sel kanker dibandingkan dengan sel normal (Jochelson, 2011).

Keluhan pasien kanker payudara dengan adanya benjolan pada payudara tanpa disertai nyeri atau hasil pemeriksaan skrining mamografi yang abnormal. Pada stadium lanjut, perubahan-perubahan pada payudara akan ditemui, seperti perubahan pada permukaan kulit payudara, keluarnya *discharge* dari puting, serta perubahan pada ukuran dan bentuk payudara. Selain itu, dapat pula ditemui pembesaran kelenjar limfa dan tanda-tanda metastase pada jaringan lain (Hoskins *et al.*, 2005).

2.2.3 Terapi Kanker

Metode terapi penyakit kanker yang umum dilakukan yaitu (Lemke *et al.*, 2008):

- a. Pembedahan atau operasi merupakan salah satu terapi kanker yang umumnya hanya berhasil pada sel kanker yang belum mengalami metastasis. Pembedahan tidak dapat dilakukan apabila sel kanker sudah menyebar ke organ lain.
- b. Radioterapi merupakan penggunaan radioaktif untuk menghancurkan sel tumor. Keuntungan metode radioterapi adalah dapat memperkecil tumor yang berukuran besar, menurunkan kambuh setempat, dan menurunkan kemungkinan terjadinya metastasis. Gabungan terapi pembedahan dan radioterapi lebih memberi keuntungan karena radioterapi dapat menghancurkan sel kanker mikroskopik yang tersisa setelah pembedahan. Jenis-jenis sinar radioterapi yang umumnya digunakan untuk terapi kanker adalah Sinar Gamma (γ) dan Sinar-X. Namun, radioterapi ini memberikan efek samping yang sangat membahayakan, yaitu dengan adanya Sinar-X yang memiliki panjang gelombang rendah dan energi tinggi mempengaruhi sel-sel normal disekitar sel-sel kanker target, hal ini dapat merusak bahkan membunuh sel-sel normal.

- c. Kemoterapi adalah terapi kanker melalui penggunaan agen kimia (obat antikanker). Berbeda dengan pembedahan dan radioterapi, kemoterapi tidak dibatasi oleh metastasis. Akan tetapi, obat antikanker tidak mampu menghancurkan semua sel kanker di dalam tubuh penderita sehingga masih harus dikombinasi dengan cara pengobatan lain seperti imunoterapi. Persyaratan obat antikanker yang baik masih sulit ditentukan karena perbedaan antara sel kanker dan sel normal cukup kecil. Kekurangan terapi dengan kemoterapi adalah pengobatan tidak selektif, sehingga dapat mempengaruhi sel-sel normal, dan menyebabkan kerusakan, serta penggunaan obat-obatan dalam jangka panjang juga dapat menyebabkan resistensi.

2.2.4 Terapi Fotodinamik (*Photodynamic Therapy/PDT*)

PDT terdiri dari tiga komponen penting yaitu fotosensitizer, cahaya, dan oksigen. Ketiganya tidak berbahaya secara individual namun dapat bereaksi secara fotokimia dan menghasilkan produk reaktif disebut oksigen singlet yang secara signifikan dapat menyebabkan kematian sel melalui apoptosis (kematian sel) dan nekrosis (Agostinis *et al.*, 2011). PDT memanfaatkan senyawa fotosensitizer yang teraktivasi akibat adanya absorpsi cahaya yang menginisiasi pembentukan singlet tereksitasi dan kemudian akan mengalami transisi berupa *long-lived* triplet tereksitasi. Triplet ini akan mengalami reaksi fotokimia jika berikatan dengan oksigen dan membentuk ROS yang dapat membunuh sel kanker, mikroba patogen, dan jaringan yang tidak diinginkan. Spesifisitas PDT pada jaringan target menyebabkan cahaya akan terlokalisasi pada daerah tersebut (Abrahamse, 2016).

Sumber cahaya untuk PDT harus menunjukkan karakteristik spektral yang cocok dengan rentang panjang gelombang serapan maksimum dari fotosensitizer untuk menghasilkan oksigen singlet dan ROS yang efektif sehingga memiliki efek sitotoksik (Robertson *et al.*, 2009). Sumber cahaya pada PDT antara lain (Bonnett, 2000):

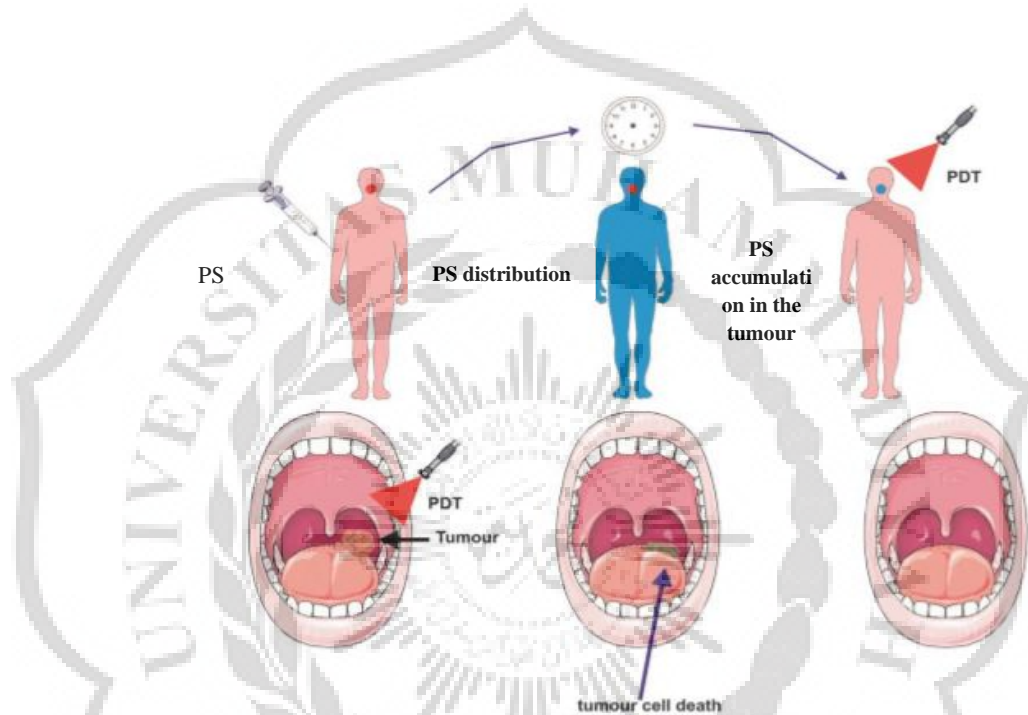
1. Bola lampu pijar
2. Lampu busur (Arc lamp)
3. LED (Light-Emitting Diodes)
4. Laser sources
5. Lampu yang difilter

Panjang gelombang yang digunakan untuk menyerap fotosensitizer pada PDT yaitu 600-850 nm. Jika pada panjang gelombang kurang dari 600 nm maka akan menyerap hemoglobin yaitu pada panjang gelombang di dekat 418, 542, dan 577 nm dan melanin pada panjang gelombang 300-500 nm, sedangkan jika pada panjang gelombang lebih dari 850 yaitu 850-900 nm foton mungkin tidak memiliki energi yang cukup untuk melakukan reaksi fotokimia dan jika lebih dari 1000 nm maka penyerapan cahaya oleh molekul air menjadi besar (Maiya, 2000).

Keuntungan dari PDT dibandingkan dengan pembedahan, radiasi, dan kemoterapi atau kombinasinya adalah berkurangnya morbiditas jangka panjang dan memiliki spesifitas dan selektivitas yang baik. Terapi PDT juga memiliki toksisitas terhadap jaringan normal tetapi dapat diminimalisir karena adanya penyinaran yang bersifat lokal hanya pada sel kanker. Pengobatan kanker secara PDT dapat dilakukan sebelum atau sesudah kemoterapi, radioterapi, atau pembedahan tanpa mengurangi modalitas terapeutik ini. Prosedur PDT banyak dilakukan secara rawat jalan sehingga tidak hanya mampu mengurangi biaya, tetapi juga memberikan perawatan yang ramah pasien (Agostini *et al.*, 2011).

Prosedur PDT dapat dilihat pada Gambar 2.1 yaitu diawali dengan menginjeksikan senyawa fotosensitizer (obat) kepada pasien, kemudian fotosensitizer tersebut akan terdistribusi ke seluruh tubuh. Setelah beberapa waktu, fotosensitizer akan secara selektif terakumulasi ke dalam sel tumor (sel kanker) dan akan tereliminasi dari jaringan normal, hal ini dapat terjadi karena fotosensitizer memiliki kemampuan untuk melokalisasi lesi neoplastik, sehingga menjadikan PDT sebagai terapi yang selektif terhadap kanker dan tidak mempengaruhi sel normal di

sekitarnya. Adanya radiasi cahaya dengan panjang gelombang dan intensitas tepat akan mengaktifkan Ps untuk menyerap cahaya dan dihadapan oksigen akan memicu terjadinya reaksi fotokimia yang dapat menghasilkan oksigen singlet (1O_2) yang dapat merusak atau menghancurkan sel kanker. Kerusakan pada makromolekul seluler yang tidak dapat diperbaiki akan menyebabkan kematian sel tumor (Agostinis *et al.*, 2011).



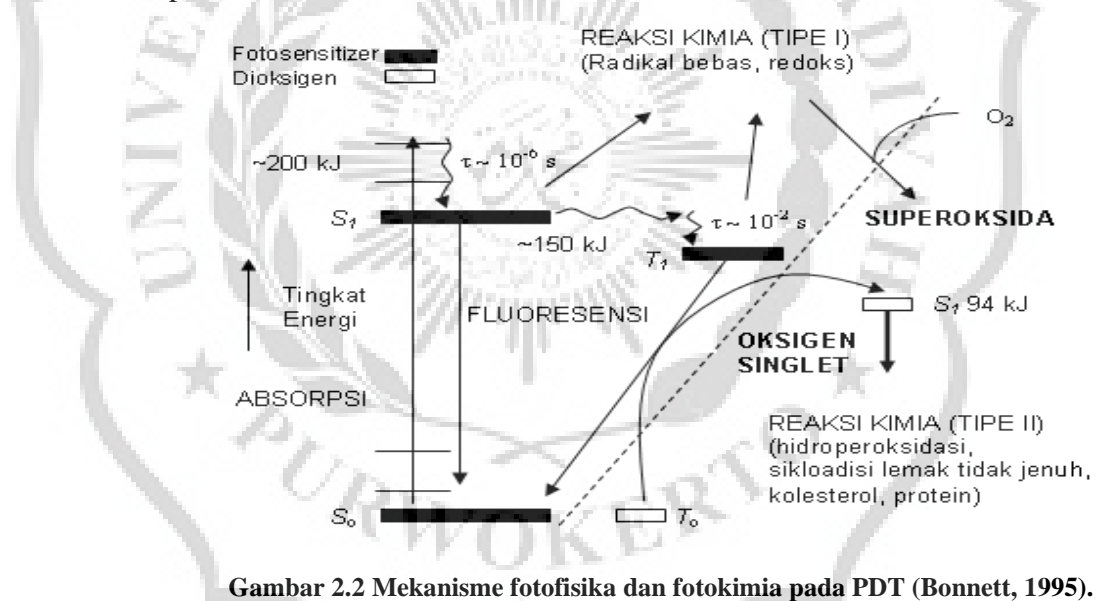
Gambar 2.1 Prinsip PDT dalam membunuh sel tumor (Agostinis *et al.*, 2011)

2.2.5 Mekanisme PDT

Mekanisme antitumor PDT terdiri dari tiga mekanisme yang saling terkait yaitu efek sitotoksik langsung sel tumor, kerusakan pada pembuluh darah sel tumor, dan induksi dari reaksi peradangan yang kuat sehingga dapat menyebabkan perkembangan kekebalan jaringan sistemik. PDT memberikan respon stress akut yang menyebabkan kerusakan mitokondria, sitokrom C, dan mengaktifasi reseptor kematian (Castano *et al.*, 2005).

Mekanisme PDT adalah fotosensitizer akan mengalami mekanisme fotofisika dan fotokimia untuk menghasilkan oksigen singlet. Sebagian besar fotosensitizer yang berada di ground state dalam keadaan singlet (memiliki 2 elektron dengan arah putaran yang

berlawanan). Penyerapan cahaya menyebabkan salah satu elektron berpindah ke orbital energi yang lebih tinggi dan keadaan ini berlangsung pendek (*nanosecond*). Fotosensitizer yang tereksitasi menjadi sangat tidak stabil kemudian akan melepaskan energi berlebih sebagai panas atau fluoresensi. Fotosensitizer yang tereksitasi juga dapat mengalami proses *intersystem crossing* dengan putaran terbalik dari satu elektron untuk membentuk keadaan triplet yang berumur panjang (*microsecond*) dan memiliki elektron berputar dalam konformasi paralel. Fotosensitizer dalam keadaan triplet akan meluruh ke ground state tanpa radiasi atau mentransfer energinya ke oksigen molekuler. Sehingga fotosensitizer akan bergerak secara spontan dari keadaan triplet menjadi singlet menghasilkan oksigen singlet (Agostini *et al.*, 2011). Mekanisme pembentukan oksigen singlet dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Mekanisme fotofisika dan fotokimia pada PDT (Bonnett, 1995).

Keadaan triplet pada fotosensitizer mengalami 2 jenis reaksi yaitu Tipe I dan Tipe II. Pada tipe I, fotosensitizer dapat bereaksi langsung dengan substrat, seperti membrane sel atau molekul, dan mentransfer proton atau elektron untuk membentuk anion atau kation radikal yang dapat bereaksi dengan oksigen menghasilkan ROS. Pada tipe II, triplet fotosensitizer pada keadaan ground state mentransfer energi secara langsung ke oksigen molekuler untuk membentuk oksigen singlet (1O_2)

keadaan eksitasi. Reaksi tipe I dan II dapat terjadi secara bersamaan dan perbedaan proses reaksi tergantung pada jenis fotosensitizer yang digunakan serta konsentrasi substrat dan oksigen (Robertson *et al.*, 2009).

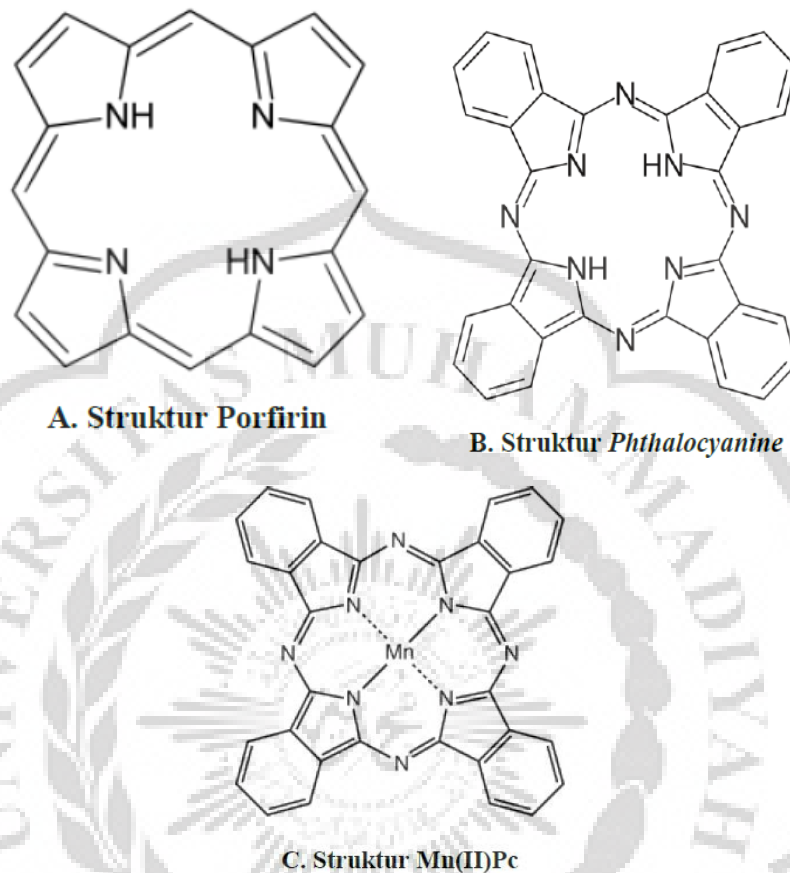
2.2.6 *Phthalocyanine* dan MnPc

Phthalocyanine merupakan fotosensitizer generasi kedua, yang memiliki sifat fisik dan kimia yang memungkinkan banyak unsur untuk dimasukkan dalam struktur dibandingkan dengan fotosensitizer lainnya. Fleksibilitas bahan kimianya memungkinkan untuk melampirkan substitusi yang berbeda diposisi dan memungkinkan untuk memiliki banyak kegunaan (Nyamu *et al.*, 2018). *Phthalocyanine* secara struktural terkait dengan porfirin. Penyerapan *phthalocyanine* pada daerah IR memiliki panjang gelombang antara 670-700 nm, hal ini memungkinkan *phthalocyanine* dapat berpenetrasi ke jaringan yang lebih dalam daripada porfirin (Ormond & Feeman, 2013).

Penambahan kompleks metalik pada *phthalocyanine* memberikan pengaruh pada *intersystem crossing* sehingga dapat menghasilkan triplet dan hasil *quantum yield* oksigen singlet ($\Phi\Delta$) yang relatif besar (Banzo, 2006). Penambahan kompleks metalik tersebut menunjukkan banyak sifat optimal lainnya seperti, efisiensi tinggi untuk menghasilkan oksigen singlet, stabilitas tinggi, fluoresensi, toksisitas intrinsik rendah, fleksibilitas tinggi dalam struktur modifikasi dan kemudahan sintesis (Sekkat *et al.*, 1999).

Salah satu senyawa turunan *phthalocyanine* yang termetalasi adalah MnPc. Dalam penelitian yang dilakukan Wiederkehr (1999) senyawa MnPc yang diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visible mempunyai panjang gelombang antara 618-719 nm berdasarkan jenis pelarut yang digunakan. MnPc atau (C₃₂H₁₆MnN₈) merupakan senyawa turunan *phthalocyanine* dengan struktur dasar tetrapirrol makrosiklik yang termetalasi. MnPc yang digunakan berupa serbuk berwarna hitam dan memiliki berat molekul (BM) sebesar 567,46 gram/mol. Senyawa MnPc dapat menghasilkan oksigen singlet

pada pH 6,3 dan 7,4 dengan nilai *quantum yield* oksigen singlet ($\Phi\Delta$) sebesar 0,14 dan pengukuran nilai *quantum yield* fluoresensi (ΦF) pada senyawa MnPc adalah 0,01 (Prasetyoningsih, 2019).

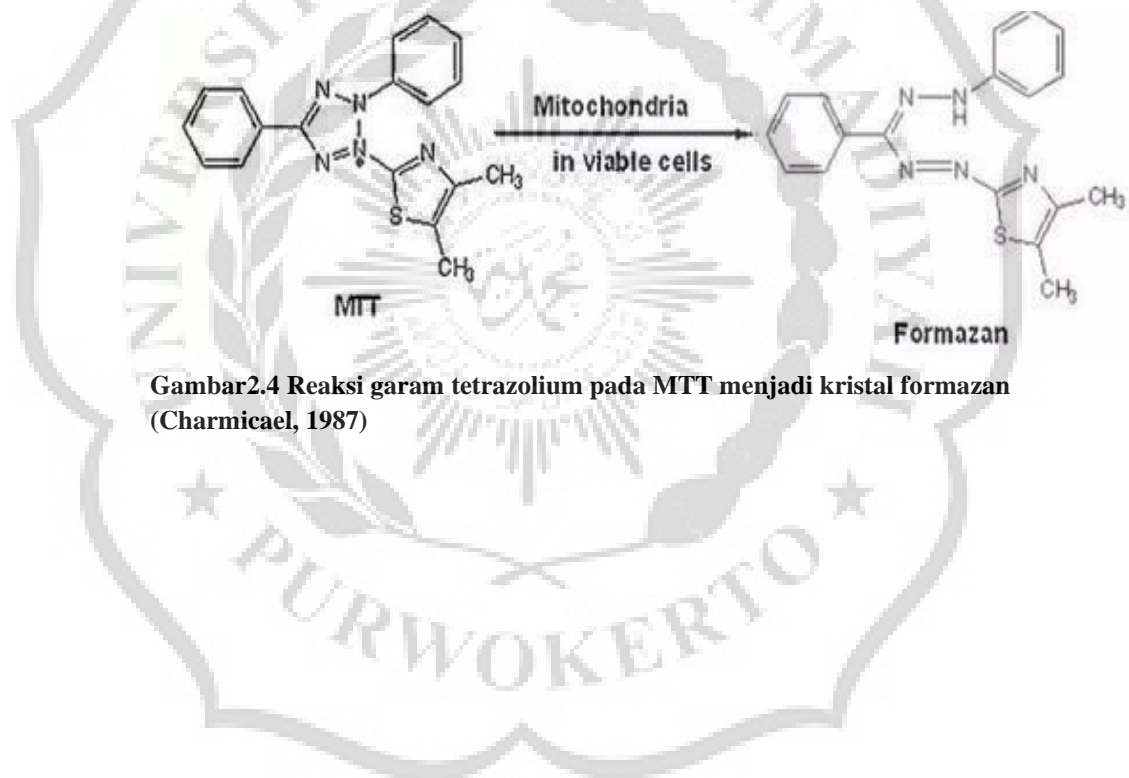


Gambar 2.3 Struktur Porphirin (A), Struktur *Phthalocyanine* (B), Struktur MnPc (C) (Merck, 2019)

2.2.7 Metode MTT

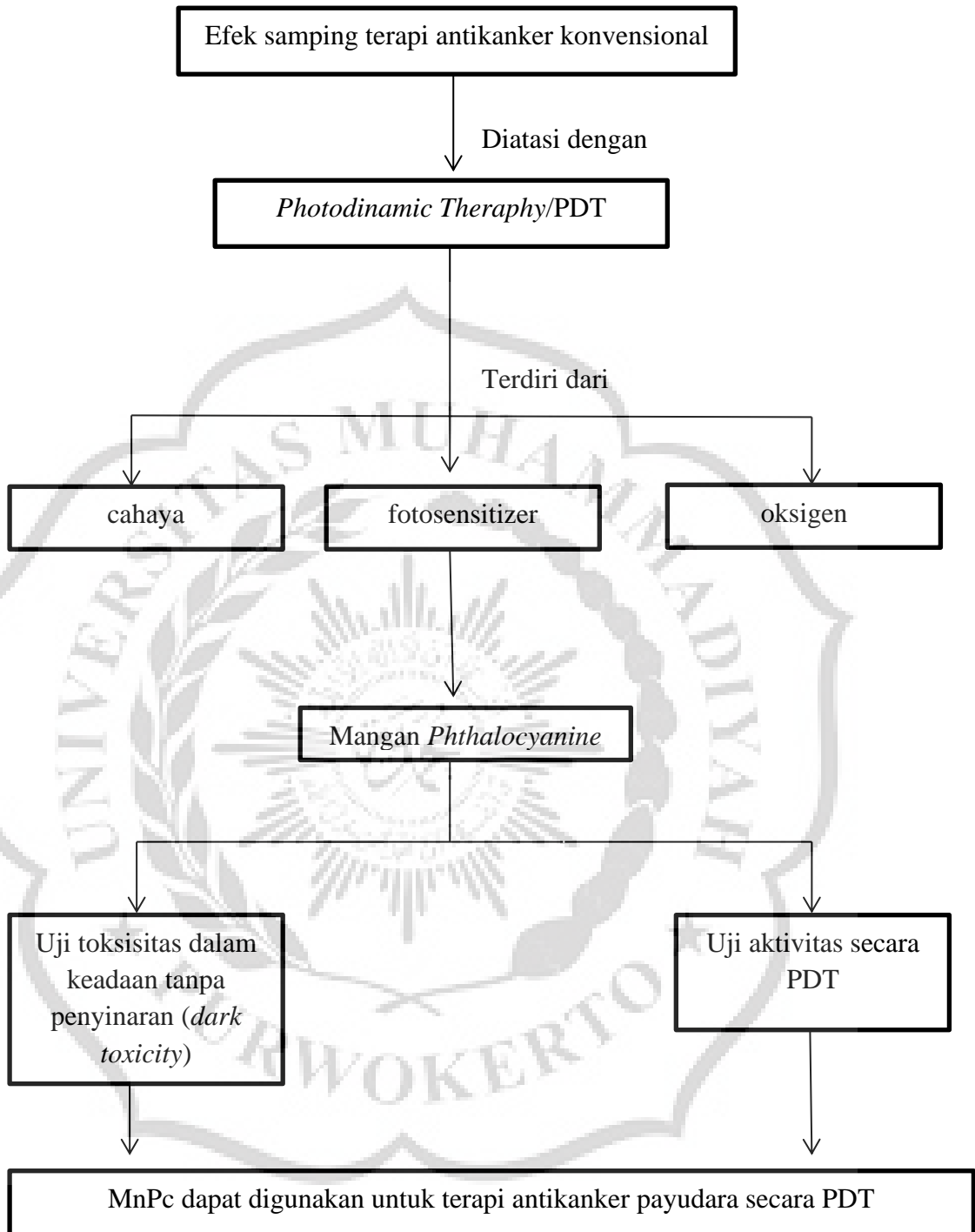
Uji MTT merupakan salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksik. Prinsip metode MTT adalah reaksi reduksi yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT yang ditunjukkan pada perubahan warna kuning menjadi ungu yang disebut dengan kristal formazan. MTT dapat menembus membran sel, berinteraksi dengan enzim suksinat dehidrogenase yang ada pada mitokondria sel hidup melalui proses reduksi yang akan mengubah NADH menjadi NAD⁻ menyebabkan terbentuknya kristal formazan yang berwarna ungu sebagai akibat putusya cincin tetrazolium sehingga terjadi perpanjangan pada ikatan rangkap terkonjugasinya. Semakin banyak sel

yang hidup maka semakin banyak pula sel yang aktif melakukan metabolisme sehingga jumlah kristal formazan yang terbentuk semakin banyak dan intensitas warna ungu semakin. Metode MTT memiliki kelebihan yaitu valid, simple, tidak memerlukan transfer sel, dan tidak menggunakan. Disamping itu, metode MTT hanya dapat mengukur jumlah sel yang masih hidup sehingga hanya mengetahui suatu senyawa dapat membunuh sel kanker dan tidak dapat mendeteksi senyawa yang hanya dapat menghambat pertumbuhan sel kanker. Hal ini lah yang menjadi kelemahan dari metode MTT. Selain itu, hasil pengukuran absorbansi absolutnya tidak sama pada berbagai galur sel (Carmichael J. *et al.*, 1987).



Gambar2.4 Reaksi garam tetrazolium pada MTT menjadi kristal formazan (Charmicael, 1987)

2.3 Kerangka Konsep



2.4 Hipotesis

Berdasarkan landasan teori yang didapat maka didapat hipotesis yaitu:

1. Senyawa MnPc memiliki aktivitas toksisitas yang lemah sebagai antikanker terhadap sel kanker payudara T47D dalam keadaan tanpa penyinaran.
2. Senyawa MnPc memiliki aktivitas sebagai antikanker terhadap sel kanker payudara T47D secara PDT.

